研究用試薬　　2015 年 4 月 20 日　改定

『 Rabbit Apo B-48 ELISA「シバヤギ®」 』取扱説明書

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書のみに従って測定を実施して下さい。なお、操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント(動画)]並びに[Q&A](キットの蓋を開けた際に一番上にあるカード(13×10cm)に記載されたパスワードをご利用下さい)をご参照下さい。

1.使用目的

本キットはウサギアポリポタンパク B-48(以下 Apo B-48 と言う)を定量的に測定するためのサンドイッチ酵素免疫測定法です。 本キットは研究のみにご使用下さい。

特長

●全反応時間は 2 時間 50 分です。
●ウサギ血清または血漿(クエン酸の使用はできません)中の Apo B-48 を測定します。
●微量な検体(標準操作法は 10μl)で測定可能です。
●1 キットは 96 ウエルです。
●標準品はウサギ由来のものです。

2.キットの保存と使用期限

キットは 2～8℃で保存して下さい(凍結厳禁)。この保存条件下でキットは製造月から 6 ヵ月(外箱のラベルに記載)までは安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

3.イントロダクション

血漿リポタンパク質(plasma lipoprotein)とは一定の割合の脂質とタンパク質からなる複合体で血清脂質の輸送を担っています。その構造の表面にはアポリポタンパク質があり、リポタンパク質の構造の安定化や、リポタンパク質代謝に関連する酵素の活性化、細胞表面にあるリポタンパク質受容体との結合など重要な役割を果たしています。アポリポタンパク質 B48(ApoB-48)は分子量 264kDa、構造的には、他の肝臓由来の血漿リポタンパク質で内因性脂質を輸送する VLDL、LDL、HDL に存在するアポリポタンパク質 B100 の 48%のアミノ酸配列を持っています。食物等に由来する外因性脂質を肝臓や末梢組織に輸送するリポタンパク質キロミクロン(Chylomicron、CM)は小腸で作られますが ApoB-48 は CM に特異的な構造タンパク質です。従って ApoB-48 を測定することは摂食後のリポタンパク質の観察には最適です。また同一試料で LDL-、HDL-コレステロールと B48 を測定することにより、外因性コレステロール、内因性コレステロールの変化を解析できます(参考文献 2)。心臓脈管系における粥状硬化症の原因の一つと見られている CM の残渣(CM レムナント)の評価にも役立つと考えられています。

リポタンパク質代謝には種差があってヒトやウサギでは CETP(Cholesterol ester transport protein,コレステロールエステル輸送タンパク質)が多く存在するが、ラットやマウスでは欠如しています。従ってこの領域ではウサギが実験動物として使用されます。この測定キットがウサギ用に作られているのはそのためです。

4.測定原理

本キットは抗ヒト Apo B-48 モノクローナル抗体(4C8)を使用しています。ヒト ApoB-48 アミノ酸配列とウサギ Apo B-48 アミノ酸配列は一つのアミノ酸が異なりますが、ウサギ血清と 4C8 抗体を使用したウェスタンブロッティング法で一つのバンドのみ確認しました。

本キットは 4C8 抗体アフィニティー精製による第一標準品を基に調製した標準品、希釈検体を抗 Apo B-48 モノクローナル抗体固相化マイクロプレートウエル中でインキュベートします。1 時間のインキュベーションと洗浄後、ビオチン結合抗 Apo B-48 抗体を加え捕捉された Apo B-48 とともに 1 時間インキュベートします。洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を加え、インキュベート後再度洗浄し、ウエルに残ったペルオキシダーゼを発色液(TMB)と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450nm(副波長 620nm)で比色測定されます。吸光度は Apo B-48 濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットし標準曲線を作製し、この標準曲線から未知検体中の濃度が決定されます。

5.注意事項

●本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の下でご使用下さい。
用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
●準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
●試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で充分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
●本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
●検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
●使用済みの検体、使用した消耗品等は 1%ホルマリン、2%グルタールアルデヒドまたは 0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。使用した消耗品や未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄して下さい。
●試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
●ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
●各ステップでの静置反応時には、ウエルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。
●ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守して下さい。また、風速（エアコン風も含む）：0.4m/sec（*①）以上、湿度 30%未満の環境下での測定は避けて下さい（9.技術上のヒントをご参照下さい）。
（*①）風速 0.4m/sec の目安は弊社 Web サイトの動画**「反応条件」**をご参照下さい。

6. 構成品

構　成　品	状　態	容　量
（A）抗体固相化 96 ウエルプレート	洗浄後使用	96 wells（8×12）／1 枚
（B）標準品	凍結乾燥品、希釈後使用	1,000 ng／1 本
（C）緩衝液	そのまま使用	60 ml／1 本
（D）ビオチン結合抗 Apo B-48 抗体	希釈後使用	100 μl／1 本
（E）ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	希釈後使用	100 μl／1 本
（F）発色液（TMB）	そのまま使用	12 ml／1 本
（H）反応停止液（1M H_2SO_4） ※取扱注意	そのまま使用	12 ml／1 本
（Ｉ）濃縮洗浄液（10×）	希釈後使用	100 ml／1 本
プレートシール		4 枚
取扱説明書		1 部

7.添付されていないが必要な器具　□チェックリスト

□精製水（蒸留水）　□標準溶液希釈用試験管　□洗浄液希釈用ガラス器具（メスシリンダー・ビーカー・瓶）　□チップ交換型ピペット（使い捨てチップで 50μl を正確にピペッティングできるもの、及び 200μl を正確にピペッティングできるもの）　□連続分注ピペット（例 Eppendorf の multipette plus）、50μl を連続分注できるもの　□ペーパータオル等の吸水性のあるもの（洗浄後にプレートに残った液を取り除く）　□撹拌器（Vortex タイプ）　□マイクロプレート振とう器（約 600～1,200 rpm）　□96 ウエルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または噴射ビン（弊社 Web サイトの動画**「洗浄操作」**をご参照下さい。）
□96 ウエルプレートリーダー（450 ±10 nm 、620nm：600～650nm）
□データ計算用ソフトウェア

8.試薬の調製

＊キットの試薬は使用前に必ず室温（20～25℃）に戻して下さい（2 時間位が目安です）。
＊6.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。
＊測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい（ご不明な際にはお問い合わせ下さい）。

【濃縮された試薬類】
［（B）標準品］：標準曲線作製用

標準品 ApoB-48（凍結乾燥品）（1,000 ng/本）に室温化された精製水 400μl を加え室温で 10 分間静置。
溶液の泡立ちを防ぐよう注意しながら充分に撹拌（1,800～2,000 rpm 10 秒 3 回）して下さい。泡立ち注意。
バイアル中の標準品が完全に溶解し、澄明な溶液となっている事を確認して下さい。
可溶化した標準溶液原液は冷蔵状態を保持し、24 時間以内にご使用下さい。また、保管する場合は可溶化後速やかに－35℃以下で凍結保存して下さい。
ヴォルテックスによる撹拌での注意点：バイアルをまずヴォルテックスに載せ、しかる後にスイッチを入れて撹拌を開始します。回転しているヴォルテックスにバイアルを載せる事は泡立ちの原因となるので避けて下さい。
凍結乾燥標準品を可溶化した溶液は大変粘性が強いです。粘性が強い標準溶液のピペッティング操作に慣れてから各標準溶液を作製して下さい。標準溶液作製の為に最初の 200μl の正確なピペッティング作業は大変重要なポイントです。
各標準溶液作製する際に倍々希釈の全てのステップでヴォルテックスでの充分な撹拌（1,800～2,000 rpm 10 秒 3 回）が必要です。但し、撹拌中に泡立ちを起こさないよう充分注意して下さい。泡立ちは再現性低下要因となります。
以下は各標準溶液作製例です。

標準溶液の容量	緩衝液	濃度(ng/ml)
原液 200μl	200μl	1,250
1,250 ng/ml 溶液 200μl	200μl	625
625 ng/ml 溶液 200μl	200μl	313
313 ng/ml 溶液 200μl	200μl	156
156 ng/ml 溶液 200μl	200μl	78
78 ng/ml 溶液 200μl	200μl	39
39 ng/ml 溶液 200μl	200μl	19.5
0 （ブランク）	200μl	0

[（D）ビオチン結合抗 Apo B-48 抗体]
100μl を充分分取できる量をご提供しています。 **濃縮液を（C）緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。**
[（E）ペルオキシダーゼ・アビジン結合物]
100μl を充分分取できる量をご提供しています。 **濃縮液を（C）緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。**
[（I）濃縮洗浄液(10×)]
濃縮洗浄液（10×）を室温化された精製水（蒸留水）で 10 倍に希釈して下さい。
例：100ml の濃縮洗浄液（10×）＋900ml の精製水（蒸留水）（96 ウエル全てを使用する場合）

【試薬の安定性と保存方法】

(A)抗体固相化 96 ウエルプレート
未使用(冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしていない)の抗体固相化ストリップは同梱のジップシールパックに戻し、そのまま 2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(B)標準品
原則として用時調製です。各標準溶液作製後の保存はしないで下さい。残余溶液は廃棄して下さい。

(C)緩衝液及び(F)発色液(TMB)
一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかり閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(D)ビオチン結合抗 Apo B-48 抗体及び(E)ペルオキシダーゼ・アビジン結合物
キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(H)反応停止液(1M H_2SO_4)
使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(I)濃縮洗浄液(10×)

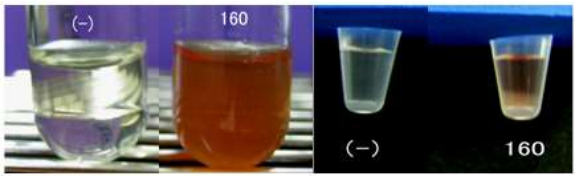
濃縮洗浄液(10×)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

9.技術上のヒント

●検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウエル／1 チップのご使用をお薦めします。
●発色液は 96 ウエルプレートに使用するまではほぼ無色または薄い青色澄明です。光を避けて保存して下さい。
●やむを得ず、測定操作を、風速：0.4m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、各ウエルの密閉度を上げる措置を講じて下さい。
例）インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細を弊社 Web サイトの動画**「反応条件」**でご確認下さい。

10.検体の調製

本キットはウサギ血清または血漿中の Apo B-48 を測定します。
●抗凝固剤は EDTA-2Na,EDTA-2K,ヘパリンをお薦めします**（クエン酸は使用不可）**。
●検体は定法にしたがって採取しすぐに測定するか、－35℃以下で凍結保存して下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し充分に撹拌して下さい。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。正しい結果が得られない原因になります。
●濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。
●妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる 2 ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認して下さい。
●検体を希釈する場合は、あらかじめ PP,PE 材質（**ガラス製は使用不可**）の試験管等において緩衝液で希釈し測定ウエルに分注して下さい（緩衝液で希釈した検体は粘性が強くなりますので、ピペッティングは注意して下さい）。**希釈目安は 10 倍です（最小希釈倍率は 5 倍）。高値検体は 10 倍以上希釈が必要な場合があります。**検体を希釈する際、泡立ちを防ぐよう注意しながら充分に撹拌（1,800～2,000rpm-10 秒 3 回）して下さい。
●溶血した検体や高脂質検体は異常値の発生原因となりますので避けて下さい。
※血液成分の影響（高脂質・溶血等）を抑制する為に原検体中の脂質（乳ビ）・溶血が次項写真より高い場合は異常値発生の原因となる場合がありますので測定に使用しないで下さい。
本キットの場合、溶血は 160mg/dL 以上で影響が現れます。



正常検体　溶血検体　正常検体　溶血検体
160mg/dL　160mg/dL

正常検体　乳ビ検体　正常検体　乳ビ検体
（高脂質検体）　（高脂質検体）

【検体の安定性と保存方法】
冷蔵保管すると Apo B-48 が失活しますので、最終濃度が 100～500KIU のアプロチニンを添加して保管して下さい。（KIU:kallikrein inhibitor unit） また、検体を長期に保管する場合は、-35℃以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。また、検体の希釈は用時調製として下さい。

11.測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。
抗体固相化プレートのシールは、プレートが充分に室温に戻ってから剥がして下さい。

(1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウエルに満たし、4 回洗浄（*③）します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(2) 検体測定ウエルに希釈検体を 50μl 添加します。
(3) 標準品測定ウエルに各濃度の標準溶液を 50μl ずつ分注します。
(4) マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌（*④）します。
(5) プレートシールを貼り、室温（20～25℃）で **1 時間静置**します。
(6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし、4 回洗浄（*③）します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

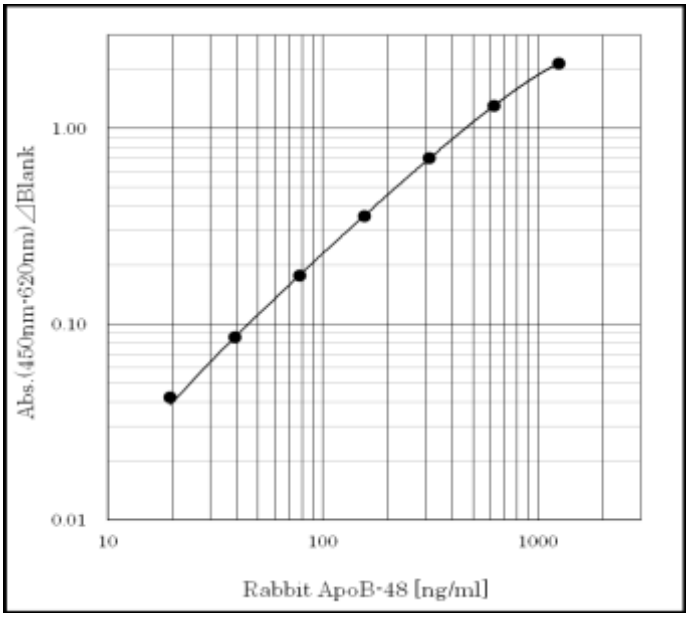
(7) 各ウエルにビオチン結合抗 Apo B-48 抗体を **50μl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*④)します。
(8) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で **1 時間静置**します。
(9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 4 回洗浄(*③)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(10) 各ウエルに、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を **50μl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌します。
(11)プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で **30 分間静置**します。
(12)反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 4 回洗浄(*③)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(13)各ウエルに、発色液を **50μl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*④)します。
(14)プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で **20 分間静置**します。
(15)各ウエルに反応停止液を **50μl** ずつ分注し、発色反応を停止します。
(16)撹拌(*④)後マイクロプレート用分光光度計で 450nm(副波長 620nm)での吸光度を測定します。副波長は 600～650nm の範囲で使用できます。
(＊③)、(＊④) 測定手順概要(7 ページ)をご参照下さい。

ワークシート(例)

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	1,250 ng/ml	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	625 ng/ml	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	313 ng/ml	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	156 ng/ml	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	78 ng/ml	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	39 ng/ml	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	19.5 ng/ml	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	0(ブランク)	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

12.計算

(1)測定毎に標準曲線を作製します。両対数を使用し X 軸を標準溶液濃度(ng/ml)、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作製して下さい。標準曲線は弊社 Web サイト「技術情報」「ELISA の標準曲線」をご参照下さい。
(2)標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度(ng/ml)を読み取ります。**読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。**
＊検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は(C)緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。
(3)反応温度が高い場合、吸光度が全体的に高くなります。測定機器によりますが吸光度の信頼性のない領域まで発色が進み標準曲線の勾配が減少する場合は、その領域は計算に使用しないで下さい。また、反応温度を 20～25℃範囲内にして再測定を実施して下さい。



＊コンピュータソフトでの演算処理では、3 次多項式または 4 パラメーターの使用をお薦め致します。
＊ウサギの臨床所見は臨床症状や他の検査結果などを総合的に判断して行う事が必要です。

グラフは標準曲線例です(吸光度は、測定環境により変動します)。
＊プレートリーダーは SUNRISE RAINBOW(TECAN)を使用

13.キットの性能

●測定範囲

Apo B-48 を 19.5～1,250 ng/ml の範囲で測定できます。

●特異性

この ELISA 系で使用されている抗体は Apo B-48 に対して特異的です。ウサギアポリポタンパク B-100 との交差性は検出感度以下です。

●精度試験（アッセイ内変動）（5 重測定、3 検体） C.V.値は 5%以内でした。

●再現性試験（アッセイ間変動）（2 重測定、2 検体、4 日間） C.V.値は 5%以内でした。

●添加回収試験

2 血清検体に異なる 3 濃度の Apo B-48 を添加し測定した結果、回収率は 93.4%から 105%でした。

●希釈直線性

2 血清検体を連続的に希釈用緩衝液で 3 段階希釈し測定した結果、直線回帰の R^2 は 0.9987 と 0.9996 でした。

14.参考値

Apo B-48 測定値：平均 1.12 μg/ml、SE 0.13 μg/ml、N 数：6、絶食 18 時間、日本白色種、雄、4 ヶ月齢
この説明書に引用されている測定値は一つの目安としてお使い下さい。採血条件、検体保管条件等で変動します。

15.トラブルシューティングと Q&A

●すべてのウエルでの反応が弱い

可能な解釈

1）標準品や検体の入れ忘れ。
2）発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
3）発色に関連する試薬溶液の取り違えや希釈調製不良。
4）酵素阻害剤の混入。
5）キット保管温度の影響（凍結した場合）。
6）プレートの過剰な洗浄。
7）発色液の温度が低かった。

●最小標準溶液濃度（19.5 ng/ml）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。

可能な解釈

洗浄が不適当、不完全であった。
（ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5～8 回に増やして下さい。）

●変動係数（CV）が大きい

可能な解釈

1）洗浄が不適当、不完全であった。
2）標準品や管理血清、または検体の撹拌が不充分であった（凍結検体の撹拌は充分に行って下さい）。
3）ピペッティング操作が一定ではなかった。

●Q-1 ：キットは分割して使用することができますか？

A-1 ：できます。プレートに貼られた透明シールをストリップの間にそってカッターなどで切り離してご使用下さい。使用しないプレートはシールを貼った状態で冷蔵庫に保管して下さい。

●Q-2 ：プレートを取り出したらウエルの中に液体が入っていましたが何ですか？

A-2 ：出荷時には保存安定液が充填してあります。

●更に詳しいトラブルシューティングや Q&A は弊社ホームページをご覧下さい。

16.参考文献

1:Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA.
Kinoshita,M., Kojima,M., Matsushima,T., and Teramoto,T. Clinica Chimica Acta, 351:115-120, 2005

2:Effects of intensive atorvastatin and rosuvastatin treatment on apolipoprorein B-48 and remnant lipoprotein cholesterol levels. Otokozawa,S., Ai,M., Van,Himbergen,T., Asztalos,BF., Tanaka,A., Stein,EA., Jones,PH., Schaefer,EJ. Atherosclerosis,205:197-201,2009

3: Determination of Immuno-reactive Rabbit Apolipoprotein B-48 in Serum by a sandwich ELISA.
Kinoshita,M., Kojima,M., Matsushima,T., Mashimo,Y.,Kigure,E.,and Teramoto,T.
Exp. Anim. 59 (4): July 2010

【測定手順概要とチェックリスト】

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後測定操作を行って下さい。

操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント(動画)]並びに「Q&A」をご参照下さい。

☐ ウエルプレート、試薬類を充分に室温(20～25℃)に戻して下さい。室温化には 2 時間位必要

☐ 濃縮洗浄液の希釈 ：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。

☐ 標準溶液の希釈(例)：標準品に室温化された精製水を 400μl 加え、溶解して下さい。動画参照

希釈例

濃度(ng/ml)		1,250	625	313	156	78	39	19.5	0
標準溶液(μl)	原液：200	→	200*	200*	200*	200*	200*	200*	0
緩衝液(μl)		200	200	200	200	200	200	200	200

＊：ひとつ高濃度の標準溶液

		各操作注意事項並びに関連情報
☐	**抗体固相化 96 ウエルプレート**	
☐	↓洗浄 4 回 (＊③)	洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
☐	**希釈検体または標準 Apo B-48 溶液　50μl**	「ピペッティング」の動画参照
☐	↓撹拌(＊④)、室温(20～25℃)、1 時間反応、静置(＊⑤) ⇨	第一反応「反応条件」の動画参照
☐	ビオチン結合抗 Apo B-48 抗体の希釈 室温化された緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。	希釈溶液の調製は第一反応中に行う
☐	↓洗浄 4 回 (＊③)	洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
☐	**ビオチン結合抗 Apo B-48 抗体　50μl**	「ピペッティング」の動画参照
☐	↓撹拌(＊④)、室温(20～25℃)、1 時間反応、静置(＊⑤) ⇨	第二反応「反応条件」の動画参照
☐	ペルオキシダーゼ・アビジン結合物の希釈 室温化された緩衝液で、100 倍に希釈して下さい。	希釈溶液の調製は第二反応中に行う
☐	↓洗浄 4 回(＊③)	洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
☐	**ペルオキシダーゼ・アビジン結合物　50μl**	「ピペッティング」の動画参照
☐	↓撹拌(＊④)、室温(20～25℃)、30 分間反応、静置(＊⑤) ⇨	第三反応「反応条件」の動画参照
☐	↓洗浄 4 回(＊③)	洗浄液除去後、直ちに発色液分注
☐	**発色液(TMB)**　TMB が室温化されていることを確認　**50μl**	分注後、濃度により青色に変色
☐	↓撹拌(＊④)、室温(20～25℃)、20 分間反応、静置(＊⑤)	
☐	**反応停止液(1M H_2SO_4)**　強酸性につき取扱注意　**50μl**	分注後、濃度により黄褐色に変色
☐	↓撹拌(＊④)	直ちに撹拌
☐	**吸光度測定(主波長 450nm、副波長 620nm:600～650nm)**	副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

(＊③) **洗浄液をウエルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。**4 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300μl／ウエルです。8 連等のマルチチャンネルピペットでの分注は洗浄不足によりブランク上昇の要因となりますのでご使用はお薦め致しません。万一、最小標準溶液濃度（19.5 ng/ml）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5～8 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5～25ml／分（ノズルの径により異なります）です。第一反応後の初回の洗浄のみウエル間のコンタミに注意して下さ

い。詳しくは**「洗浄操作」**の動画をご参照下さい。
（＊④）撹拌の目安は 600～1,200rpm-10 秒間、3 回。**「撹拌操作」**の動画をご参照下さい。
（＊⑤）撹拌終了後プレートシールを貼って静置して下さい。**「反応条件」**の動画をご参照下さい。
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

ワークシート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

【測定名】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
【所属】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
【測定者】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿【測定日】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
【キットロット番号】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿【有効期限】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
【備考】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

【製品名】　；Rabbit Apo B-48 ELISA「シバヤギ®」
【コード番号】；AKRB48
【英語表記】；Rabbit Apo B-48 ELISA KIT (AKRB48, Shibayagi Co., Ltd, Gunma, Japan)
【お問い合せ先】
製造／発売元；株式会社シバヤギ　〒377-0007　群馬県渋川市石原 1062-1
TEL.0279-25-0279　FAX.0279-23-0313
<E-mail>syc-info@shibayagi.co.jp　<URL>http://www.shibayagi.co.jp